

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07313178 A**

(43) Date of publication of application: **05 . 12 . 95**

(51) Int. Cl **C12P 13/20**

(21) Application number: **06106382**

(22) Date of filing: **20 . 05 . 94**

(71) Applicant: **NIPPON SHOKUBAI CO LTD**

(72) Inventor: **MUKOYAMA MASAHARU
HAYASHI TAKAYA
SAKANO KOICHI**

(54) PRODUCTION OF L-ASPARTIC ACID

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a method for producing L-aspartic acid from maleic acid and ammonia without formation of ammonium salt as a byproduct.

CONSTITUTION: An enzyme-containing material having both maleic acid isomerase and aspartase activities or a combination of enzyme-containing materials respectively

having maleic acid isomerase and aspartase activity is allowed to act on a culture medium containing maleic acid, ammonia and an alkali metal ion to give L-aspartic acid. Then, the reaction medium containing L-aspartic acid is treated with a mineral acid to recover the crystals of L-aspartic acid by filtration, while the waste solution containing alkali salt of the mineral acid is expelled.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-313178

(43) 公開日 平成7年(1995)12月5日

(51) Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 13/20

2121-4B

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平6-106382

(71) 出願人 000004628

株式会社日本触媒

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

(22) 出願日

平成6年(1994)5月20日

(72) 発明者 向山 正治

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株

式会社日本触媒筑波研究所内

(72) 発明者 林 隆哉

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株

式会社日本触媒筑波研究所内

(72) 発明者 阪野 公一

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株

式会社日本触媒筑波研究所内

(54) 【発明の名称】 L-アスパラギン酸の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 マレイン酸とアンモニアからL-アスパラギン酸を生産する際、多量のアンモニウム塩を排出しないL-アスパラギン酸の製造方法を提供する。

【構成】 マレイン酸とアンモニアおよびアルカリ金属イオンを含む基質媒体に、マレイン酸イソメラーゼ活性とアスパルターゼ活性の両方の活性を有する酵素含有物、またはマレイン酸イソメラーゼ活性を有する酵素含有物とアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりL-アスパラギン酸を生成せしめ、次にL-アスパラギン酸を含有する反応液媒体に鉍酸を加え、L-アスパラギン酸の結晶を濾別・回収すると共に、鉍酸のアルカリ金属塩を主成分とする廃液を排出するL-アスパラギン酸の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マレイン酸とアンモニアおよびアルカリ金属イオンを含む基質媒体に、マレイン酸イソメラーゼ活性とアスパルターゼ活性の両方の活性を有する酵素含有物、またはマレイン酸イソメラーゼ活性を有する酵素含有物とアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりレーアスバラギン酸を生成せしめ、次にレーアスバラギン酸を含有する反応液媒体に鉍酸を加え、レーアスバラギン酸の結晶を濾別・回収すると共に、鉍酸のアルカリ金属塩を主成分とする廃液を排出することを特徴とするレーアスバラギン酸の製造方法。

【請求項2】 マレイン酸イソメラーゼ活性とアスパルターゼ活性の両方の活性を有する酵素含有物、またはマレイン酸イソメラーゼ活性を有する酵素含有物とアスパルターゼ活性を有する酵素含有物が、酵素活性を有する微生物菌体、菌体破砕物、部分精製酵素、もしくは精製酵素またはこれらを含んでなる固定化酵素もしくは固定化微生物である請求項1記載の方法。

【請求項3】 マレイン酸に対して0.5～1.5倍モルのアルカリ金属イオンを含む請求項1～2のいずれかに記載の方法。

【請求項4】 アルカリ金属イオンがナトリウムイオンおよび/またはカリウムイオンである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はマレイン酸とアンモニアからレーアスバラギン酸を生産する際、多量のアンモニウムイオンを含んだ廃水を排出しないようにする方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、マレイン酸アンモニウムからレーアスバラギン酸を製造する方法としては、シュードキナス属、バチルス属、アエロバクター属、ブレヴィバクテリウム属に属し、マレイン酸よりレーアスバラギン酸を生成せしめる特徴を有する微生物を用いる方法（特公昭42-11993号、特公昭42-11994号）が知られている。

【0003】 しかしこれらの方法ではマレイン酸とアンモニアまたはアンモニウム塩よりレーアスバラギン酸を製造することを特徴としており反応液からレーアスバラギン酸を回収するために硫酸などの鉍酸を用いて、レーアスバラギン酸の結晶を析出させ、これを濾別する方法がとられているが、高濃度の硫酸アンモニウム等のアンモニウム塩を含有した廃水が大量に排出されるという問題を有していた。

【0004】 水溶液中のアンモニウムイオンの除去は廃水処理の面でも非常に困難であり、湖沼や瀬戸内海などの内湾ではアンモニウムイオンを含む窒素濃度が上昇す

ることによる水質汚染などの問題が生じてきている。また最近、工場廃水中の窒素濃度の規制についても各官庁で検討が行われているようである。従って、レーアスバラギン酸の製造においても硫酸などの副生成物が多量に発生しない系の開発が望まれている。

【0005】 米国特許4560653ではレーアスバラギン酸の生産の際にアスパルターゼもしくはアスパルターゼ生産菌をフマル酸とアンモニアに作用させて生成したアスバラギン酸アンモニウム水溶液にマレイン酸を添加して酸性にすることによってレーアスバラギン酸を晶析させ、濾液を異性化することによって反応液のリサイクルを行う方法が提案されている。この方法は、硫酸などの副生成物が発生しない方法である。しかしこの方法ではレーアスバラギン酸の晶析に用いたマレイン酸を、臭素イオンを含んだ触媒を用いて、アスパルターゼが作用できるフマル酸に異性化し、異性化後、触媒を除去する工程が含まれており、レーアスバラギン酸の製造工程が煩雑になる欠点を有している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的はマレイン酸とアンモニアからレーアスバラギン酸を生産する際、多量のアンモニウム塩を排出しない、レーアスバラギン酸の製造方法を提供しようとするものである。

【0007】 本発明者らはこのような高濃度のアンモニウムイオンを含有した廃水が大量に排出されない、簡易なレーアスバラギン酸の製造方法について鋭意検討を行った結果、この反応の基質であるマレイン酸を中和するのに、従来用いられていたアンモニアに加えてアルカリ金属イオンをあわせて用いても、反応の転化率、選択率共にアンモニア単独の場合と遜色ない結果が得られることを見だし本発明を完成させるに至った。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明はマレイン酸とアンモニアおよびアルカリ金属イオンを含む基質媒体に、マレイン酸イソメラーゼ活性とアスパルターゼ活性の両方の活性を有する酵素含有物、またはマレイン酸イソメラーゼ活性を有する酵素含有物とアスパルターゼ活性を有する酵素含有物を作用せしめることによりレーアスバラギン酸を生成せしめ、次にレーアスバラギン酸を含有する反応液媒体に鉍酸を加え、レーアスバラギン酸の結晶を濾別・回収すると共に、鉍酸のアルカリ金属塩を主成分とする廃液を排出することを特徴とするレーアスバラギン酸の製造方法に関するものである。

【0009】 本発明に用いるマレイン酸はマレイン酸あるいはマレイン酸塩から選ばれるものであって、これらの混合物でもよい。反応の際のマレイン酸濃度は通常5～30重量%が好ましいがマレイン酸塩の溶解度と生産性の面から特に10～25重量%が好ましい。

【0010】 本発明に用いられるアンモニアは液体アンモニア、アンモニウム水溶液等が使用可能であるが、取扱

上、アンモニア水溶液が有利である。

【0011】アンモニア水の濃度としては特に限定されるものではないが、工業的には10～35重量%が利用するのに好ましい。

【0012】本発明に使用するアルカリ金属イオンの量はマレイン酸に対して0.5～1.5倍モル、好ましくは0.9～1.3倍モル、より好ましくは1.10～1.25倍モル用いるのがよい。

【0013】本発明に用いるアルカリ金属イオンとしてはナトリウムイオン、カリウムイオンのほか各種のアルカリ金属イオンが使用できるが、経済的には水酸化ナトリウムか水酸化カリウムをアルカリ金属イオンとして用いるのが好ましい。またこれらのアルカリ金属水酸化物は2種以上のものを混合して用いても差し支えない。さらにマレイン酸をアルカリ金属イオンで中和するかわりにマレイン酸のアルカリ金属塩をそのまま用いても差し支えない。

【0014】反応液のpHは5から10の範囲、好ましくは7.0～9.0の範囲、さらに好ましくはpH7.5～8.5程度にアルカリ金属イオンおよびアンモニアを添加して調整すればよい。

【0015】本発明に使用するマレイン酸イソメラーゼ活性とアスパルターゼ活性の両方の活性を有する微生物としては、例えばアルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属に属する微生物 (アルカリゲネス・フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) ATCC 8750) などマレイン酸よりレーアスパラギン酸を収率よく生成する特徴を有する微生物であれば特に限定されない。

【0016】またマレイン酸イソメラーゼ活性を有する微生物およびアスパルターゼ活性を有する微生物をくみあわせて使用することも可能である。マレイン酸イソメラーゼ活性を有する微生物としては例えばシュドモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物 (シュドモナス・マルトフィリア (*pseudomonas maltophilia*) ATCC 13270) などマレイン酸よりフマル酸を収率よく生成する特徴を有する微生物であれば特に限定されない。また、アスパルターゼ活性を有する微生物としては例えばエッシャーシア (*Escherichia*) 属に属する微生物 (エッシャーシア・コリ (*Escherichia coli*) ATCC 11303、ATCC 9637、ATCC 27325)、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属に属する微生物などフマル酸よりレーアスパラギン酸を収率よく生成する特徴を有する微生物であれば特に限定されない。

【0017】マレイン酸イソメラーゼ活性を有する微生物とアスパルターゼ活性を有する微生物は混合して反応に用いてもまた別々に反応に用いることも可能である。

【0018】本発明の方法に使用される上記微生物菌体の調製に使用する培地は特に限定されるものではなく、一般の微生物に使用される培地でよい。培地の炭素源と

しては、例えば、グルコース、フラクトース、ショ糖などの糖類、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酢酸などの有機酸、およびエタノールなどのアルコールが使用できる。培地の窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素などの無機塩類が使用できる。さらにペプトン、酵母エキス、コーンステイープリカー、カサミノ酸などの有機窒素源も使用できる。無機塩としては、燐酸一水素カリウム、燐酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄等が用いられる。また必要に応じてビタミン類も適宜添加できる。

【0019】培養は通気攪拌、振とうなどの好気的条件下で行い、培養温度は20～40℃、好ましくは28～37℃である。培養液のpHはpH5～10、好ましくはpH7～8で行い、pHの調整は酸またはアルカリの添加により行う。培養開始時の培地中の炭素源の濃度は0.05～10重量%、好ましくは0.5～2重量%で行う。培養期間は10時間から4日間、好ましくは15時間から3日間で行う。上記のごとく培養して得られる微生物菌体は遠心または濾過により集め、水または適当な緩衝液を用いて洗浄し、本発明の反応に使用する。本発明の反応は微生物菌体をそのまま用いることもできるし、超音波、摩砕、凍結融解、酵素処理などにより物理的または生化学的に処理して破砕した菌体破砕物、あるいはこれから精製した酵素および菌体もしくは菌体破砕物、酵素をポリアクリルアミド、アルギン酸、 κ -カラギーナンなどの適当な天然系高分子、あるいは合成高分子を担体として固定化して用いることも可能である。

【0020】また反応に用いる酵素含有物に含まれるフマラーゼ活性など該反応の妨げになりうる酵素を予め失活させた後に反応に用いることも可能である。

【0021】マレイン酸とアンモニアとの反応はそれらを溶解した水性媒体、たとえば水または緩衝液で行う。反応の際の原料のマレイン酸の濃度は5～25重量%好ましいが、マレイン酸塩の溶解性と生体触媒の反応性を考えると特に10～25重量%の範囲の水溶液で反応させるのが効果的である。

【0022】また反応液にはさらに塩化マンガ、硫酸マンガなどのマンガ塩、または塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなどのマグネシウム塩を0.1～50mM、特に1～10mMの濃度に添加することが好ましい。

【0023】またメルカプトエタノールなどのチオ化合物を0.1～50mM、特に1～10mMの濃度に添加することが好ましい。

【0024】本発明における反応槽の態様は特に限定されないが、例えば、バッチ型反応装置、カラム型反応装置など従来から知られている反応槽で反応を行うことができる。反応槽は1つであってもよいし、複数であっても差し支えない。またカラム型の反応装置の場合には、通

液速度をカラムに充填されている酵素の種類によって変えて反応することも可能である。

【0025】マレイン酸とアンモニアとの反応の際の温度は低温では反応速度が低下するため通常20℃程度を下限とし、高温下ではマレイン酸イソメラーゼ活性とアスパルターゼ活性の両方の活性を有する酵素含有物、またはマレイン酸イソメラーゼ活性を有する酵素含有物とアスパルターゼ活性を有する酵素含有物の混合物の失活を招くため50℃程度を上限とするのが好ましく、より好ましくは25～40℃の範囲で行うのがよい。

【0026】反応後の液中のL-アスパラギン酸は常法通り等電点沈殿法等により容易に回収できる。例えば反応液に硫酸等の鉱酸を添加しpHをL-アスパラギン酸の等電点である2.77程度に低下させ、冷却することによって結晶を析出させれば良い。

【0027】本発明に用いる鉱酸としては硫酸、塩酸、リン酸などが使用できる。

【0028】析出したL-アスパラギン酸の結晶は通常の方法、例えば濾過、遠心分離、デカンテーションなどの方法で液から分離し、通常の方法にしたがって乾燥される。L-アスパラギン酸の結晶を分離した液中のアンモニウムイオンの濃度はアンモニア単独で行なう方法に比べて数分の一から数十分の一となっており、主成分は鉱酸のアルカリ金属塩である。

【0029】

【作用】本発明によれば、マレイン酸とアンモニアからL-アスパラギン酸の製造に際して、廃水の主成分を従来の鉱酸のアンモニウム塩から鉱酸のアルカリ金属塩にかえることができ、近年の工業廃水に対する窒素規制に対応することができる。

【0030】

【実施例】次に本発明の方法を実施例をあげて説明するが、本発明はかかる実施例のみに限定されるものではない。

【0031】実施例1

マレイン酸1重量%、マロン酸0.5重量%、硫酸アンモニウム0.5重量%、磷酸1水素カリウム0.3重量%、磷酸2水素カリウム0.1重量%、硫酸マグネシウム7水塩0.05重量%、酵母エキス2重量%からなる組成の培地(pH6.5)6Lを全容10Lのジャーファーメンターに仕込、アルカリゲネス・フェカリス(*Alcaligenes faecalis*) ATCC 8750を接種し、30重量%のマレイン酸水溶液を用いて培地中のpHを7.5に保ちながら培養を行った。培養20時間後に培養を終了し菌体を遠心分離によって集めた。この菌体を4等分して、-80℃で凍結して冷蔵した。

【0032】200gのマレイン酸、0.25gの硫酸マグネシウム7水塩、0.2gのメルカプトエタノールおよび1gのTrition X-100をイオン交換水に溶解し、水酸化ナトリウムを82.8g(対マレイン

酸1.2倍モル)添加後、25重量%アンモニア水溶液を添加して、pHを8.3に調節し、水を追加して全量を1Lとし、これを反応基質水溶液とした。

【0033】この反応基質水溶液に先に4等分した凍結菌体の一つを入れ、30℃で緩やかに振盪しながら24時間反応させた。この反応液中のL-アスパラギン酸は215.7gであった。この反応液を遠心分離して菌体を除いた後、硫酸を添加し、pHを2.8に調節した。これを60℃に加熱、その後冷却した。冷却後、吸引濾過器で吸引濾過し、濾過器内の結晶を約150mlの水で吸引しながら洗浄し、この結晶を乾燥し重量、純度を調べたところ、重量210.4g、純度99.0%であった。濾液1L中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約2.1g/Lであった。

【0034】実施例2

実施例1において、反応基質に加える水酸化ナトリウムの量を100g(対マレイン酸1.45倍モル)にした以外は実施例1と同様な操作を行った。反応後の反応液中のL-アスパラギン酸は170gであった。実施例1と同様な方法でL-アスパラギン酸の晶析を行い、重量217g、純度77%のL-アスパラギン酸を得た。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約0.80g/Lであった。

【0035】実施例3

実施例1において、反応基質に水酸化ナトリウムを水酸化カリウムに変え、水酸化カリウムを96.7g(対マレイン酸1.0倍モル)添加する以外は、実施例1と同様な反応を行った。反応後の反応液中のL-アスパラギン酸は224gであった。実施例1と同様な方法でL-アスパラギン酸の晶析を行い、重量221g、純度98.9%のL-アスパラギン酸を得た。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約6.3g/Lであった。

【0036】比較例1

実施例1において、反応基質に水酸化ナトリウムを加えずに25重量%アンモニア水のみを用いて、pHを8.3に調節した以外は、実施例1と同様の操作を行なった。反応後の反応液中のL-アスパラギン酸は227.0gであった。この反応液を実施例1と同様な方法で処理し結晶と母液を得た。結晶を乾燥し重量、純度を調べたところ、重量222.3g、純度99.1%であった。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約35.9g/Lであった。

【0037】実施例4

マレイン酸1重量%、硫酸アンモニウム0.5重量%、磷酸1水素カリウム0.3重量%、磷酸2水素カリウム0.1重量%、硫酸マグネシウム7水塩0.05重量%、酵母エキス2重量%からなる組成の培地(pH6.5)6Lを全容10Lのジャーファーメンターに仕込、シュードモナス・マルトフィリア(*Pseudomonas maltophilia*)

hilia) ATCC 13270を接種し、30重量%のマレイン酸水溶液を用いて培地中のpHを7.5に保ちながら30℃で通気攪拌培養を行った。培養20時間目後に培養を終了し菌体を遠心分離によって集めた。これを4等分して、-80℃で凍結して冷蔵した。

【0038】また、フマル酸2重量%、コーンステープ・リカー2重量%、酵母エキス2重量%、リン酸1カリウム0.1重量%、硫酸マグネシウム7水塩0.05重量%の組成からなる培地(アンモニアでpHを7.5に調整)1Lを全容2Lのジャーファーメンターに仕込、エッシャーシア・コリ(Escherichia coli) ATCC 11303を接種し、37℃で通気攪拌培養を行った。培養20時間目後に培養を終了し菌体を遠心分離によって回収した。これを4等分して、-80℃で凍結して冷蔵した。

【0039】200gのマレイン酸20g、0.25gの硫酸マグネシウム7水塩、0.2gのメルカプトエタノールおよび1gのTriton X-100をイオン交換水に溶解し、水酸化ナトリウムを82.8g(対マレイン酸1.2倍モル)添加後、25重量%アンモニア水溶液を添加して、pHを8.3に調節し、水を追加して全量を1Lとし、これを反応基質水溶液とした。

【0040】この反応基質水溶液に先に4等分した2種類の凍結菌体を混合して入れ、30℃で緩やかに振盪しながら24時間反応させた。この反応液中のL-アスパラギン酸は219.2gであった。この反応液を遠心分離して菌体を除いた後、硫酸を添加し、pHを2.8に調節した。これを60℃に加熱、その後冷却した。冷却後、吸引濾過器で吸引濾過し、濾過器内の結晶を約150mlの水で吸引しながら洗浄し、この結晶を乾燥し重量、純度を調べたところ、重量214.4g、純度99.0%であった。濾液1L中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約1.0g/Lであった。

【0041】実施例5

実施例4において、反応基質に加える水酸化ナトリウムの量を100g(対マレイン酸1.45倍モル)にした以外は実施例1と同様な操作を行った。反応後の反応液中のL-アスパラギン酸は177.5gであった。実施例1と同様な方法でL-アスパラギン酸の晶析を行い、重量217.5g、純度80.2%のL-アスパラギン酸を得た。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約0.85g/Lであった。

【0042】実施例6

10 実施例4において、反応基質に水酸化ナトリウムを水酸化カリウムに変え、水酸化カリウムを96.7g(対マレイン酸1.0倍モル)添加する以外は、実施例1と同様な反応を行った。反応後の反応液中のL-アスパラギン酸は225.1gであった。実施例1と同様な方法でL-アスパラギン酸の晶析を行い、重量221.5g、純度99.2%のL-アスパラギン酸を得た。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約6.1g/Lであった。

【0043】比較例2

20 実施例4において、反応基質に水酸化ナトリウムを加えずに25重量%アンモニア水のみを用いて、pHを8.3に調節した以外は、実施例1と同様の操作を行なった。反応後の反応液中のL-アスパラギン酸は227.2gであった。この反応液を実施例1と同様な方法で処理し結晶と母液を得た。結晶を乾燥し重量、純度を調べたところ、重量222.9g、純度99.2%であった。濾液中のアンモニア濃度を測定したところ、NH₃として約35.5g/Lであった。

【0044】

30 【発明の効果】本発明によれば、高濃度の硫酸アンモニウム水溶液などの環境上好ましくない副生成物を伴わずにL-アスパラギン酸を効率よくフマル酸を原料に製造することができる。

